

**WEST****End of Result Set**

Generate Collection

Print

L48: Entry 2 of 2

File: DWPI

Jun 29, 1993

DERWENT-ACC-NO: 1993-239912

DERWENT-WEEK: 199330

COPYRIGHT 2002 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Cosmetic material having high skin whitening effect and storage stability - contains extract from body of Lactobacillus lactic acid bacterium sepd. from kefir particle

PATENT-ASSIGNEE:

ASSIGNEE

CODE

DOWA MINING CO LTD

DOWA

PRIORITY-DATA: 1991JP-0353861 (December 18, 1991)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 05163134 A	June 29, 1993		005	A61K007/48

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	DESCRIPTOR
JP05163134A	December 18, 1991	1991JP-0353861	

INT-CL (IPC): A61K 7/48

ABSTRACTED-PUB-NO: JP05163134A

BASIC-ABSTRACT:

Cosmetic material contains the extract from the body of a Lactobacillus lactic acid bacterium(ria) sepd. from the kefir particle. The culture medium is e.g. a modified Rogosa medium. The extn. is effected with e.g. lower alcohol(s) and/or water.

USE/ADVANTAGE - The material controls tyrosinase activity and melanism, resulting in good whitening of the skin and removal of active oxygen

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS: COSMETIC MATERIAL HIGH SKIN WHITE EFFECT STORAGE STABILISED CONTAIN EXTRACT BODY LACTOBACILLUS LACTIC ACID BACTERIUM SEPARATE KEFIR PARTICLE

DERWENT-CLASS: D16 D21

CPI-CODES: D05-C; D08-B09A;

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1993-106793

**(54) SKIN COSMETIC**

(11) 5-163133 (A) (43) 29.6.1993 (19) JP  
 (21) Appl. No. 3-353277 (22) 16.12.1991  
 (71) KANEBO LTD (72) TADASHI MATSUI(1)  
 (51) Int. Cl<sup>5</sup>. A61K7/48, A61K7/00

**PURPOSE:** To obtain a skin cosmetic by combining a mucopolysaccharide with a soluble shell membrane and a diacyl type or monoacyl type phospholipid, having sufficient moisture retention effects, excellently skin beautifying effects and preferable function characteristics.

**CONSTITUTION:** A mucopolysaccharide is combined with a soluble shell membrane and a diacyl type or monoacyl type phospholipid to give a skin cosmetic. The mucopolysaccharide is hyaluronic acid or dermatannic acid and the amount of the mucopolysaccharide blended is about 0.001-5%. The soluble shell membrane is obtained by solubilizing a membrane stuck to the inner part of egg shell of bird and the amount of the shell membrane blended is about 0.01-10%. 1,2-Dipalmitoyl-3-glycerolphosphorylcholine may be cited as the diacyl type phospholipid and 2-palmitoyl-3-glycerolphosphorylcholine as the monoacyl type phospholipid and the amounts of the diacyl type and monoacyl type phospholipid blended are about 0.01-2.0%, respectively.

**(54) COSMETIC**

(11) 5-163134 (A) (43) 29.6.1993 (19) JP  
 (21) Appl. No. 3-353861 (22) 18.12.1991  
 (71) DOWA MINING CO LTD (72) MASAYUKI IWATA(2)  
 (51) Int. Cl<sup>5</sup>. A61K7/48, A61K7/00

**PURPOSE:** To obtain a cosmetic having excellently beautifying effects on skin, sufficient shelf stability and high safety.

**CONSTITUTION:** First, kefia granules are inoculated into 10% reduced defatted milk, subjected to subculture every day at 20°C and activated. The activated kefia granules are cultured by using a medium for separating cells of lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus* and the cells of lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus* are separated. Then, the cells are inoculated into a medium, subjected to stationary culture or mild spinner culture at 20-35°C and the culture solution is centrifuged to collect cells. 1 pt.wt. of the cells is extracted with 2-10 pts.wt. solvent at 0-40°C for 1-24 hours, the obtained filtrate is concentrated to give a cell extract (extracted solution). A cosmetic is blended with 0.01-0.5% of the extract as an active ingredient.

**(54) BEAUTIFYING COSMETIC COMPOSITION**

(11) 5-163135 (A) (43) 29.6.1993 (19) JP  
 (21) Appl. No. 3-360926 (22) 16.12.1991  
 (71) SUNTORY LTD (72) KEIICHI ABE(3)  
 (51) Int. Cl<sup>5</sup>. A61K7/48, A61K7/00, A61K35/78, A61K35/84

**PURPOSE:** To obtain a composition for beautifying cosmetic, having safety and high effects.

**CONSTITUTION:** A beautifying cosmetic composition comprising at least one of an extract of *Auricularia auricula-juade* Quel. of the family Auriculariaceae, an extract of *Wasabia japonica* Matsum. of the family Cruciferae and an extract of *Fogopyrum esculentum* Moench of the family Polygonaceae as an active ingredient. The extract extremely inhibits melanism without showing cytotoxicity. Consequently, the beautifying cosmetic composition comprising at least one of these extracts and their purified substances has safety and high beautifying effects.

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-163134

(43)公開日 平成5年(1993)6月29日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 7/48		9051-4C		
7/00	X	8615-4C		
	K	8615-4C		
	W	8615-4C		

審査請求 未請求 請求項の数1(全 5 頁)

(21)出願番号	特願平3-353861	(71)出願人	000224798 同和鉱業株式会社 東京都千代田区丸の内1丁目8番2号
(22)出願日	平成3年(1991)12月18日	(72)発明者	岩田 雅之 東京都千代田区丸の内1丁目8番2号 同 和鉱業株式会社内
		(72)発明者	田淵 健太 東京都千代田区丸の内1丁目8番2号 同 和鉱業株式会社内
		(72)発明者	小平 了二 東京都千代田区丸の内1丁目8番2号 同 和鉱業株式会社内
		(74)代理人	弁理士 丸岡 政彦

(54)【発明の名称】 化粧品

(57)【要約】

【目的】 優れた皮膚美白効果を有し、かつ十分な保存安定性および高い安全性を有する化粧料の提供。

【構成】 まず、ケフィア粒を10%還元脱脂乳に接種し、20℃で毎日植え継いで活性化させ、この活性化ケフィア粒をラクトバチルス属乳酸菌体分離用培地を用いて培養し、ラクトバチルス属乳酸菌体を分離する。次に、上記菌体を培地に接種し、20℃ないし35℃の温度で静置培養あるいは緩やかな攪拌培養を行った後、培養液を遠心分離するなどして菌体を集める。次いで、この菌体1重量部に対して、溶剤を2~10重量部加え、0~40℃にて1~24時間抽出を行い、得られた濾液を濃縮することによって菌体抽出物(抽出液)を得る。この抽出物を有効成分として0.01~5%化粧料に配合する。

**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** ケフィア粒から分離したラクトバチルス属乳酸菌の菌体抽出物を配合したことを特徴とする化粧料。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

**【産業上の利用分野】** 本発明は、優れた皮膚美白効果および活性酸素消去効果を有する乳酸菌の培養菌体抽出物を配合した化粧料に関するものである。

**【0002】**

**【従来の技術】** 日焼けによる色黒、シミ、ソバカス等は、黒褐色無定形の色素であるメラニンの生成により生じるものと考えられており、このメラニンは、皮膚が紫外線などの外的刺激を受けると、皮膚のメラニン細胞中に存在するチロシナーゼ（チロシン酸化酵素）が活性化し、たんぱく質構成アミノ酸の一種であるチロシンが酸化されて生成する。したがって、メラニン生成に関与するチロシナーゼの活性を抑制することにより肌を白くする効果が期待されるため、チロシナーゼ活性抑制成分の化粧料への配合が提唱されていた。

**【0003】** 従来、美白効果を有する化粧料として、特公昭55-43443号「美白化粧料」や特公昭54-974号「生薬抽出物配合組成物」に開示されるように、アスコルビン酸またはその誘導体を配合したものが知られている。他にも、アルブチンを配合した皮膚外用剤（特開昭60-16906号等）やコウジ酸を配合した漂白化粧料（特公昭32-8100号）、植物成分

（特開昭63-2913号他）または動物成分（特開昭63-8312号他）から抽出した化粧料が美白効果を有するものとして公知である。

**【0004】** しかしながら、上記従来の化粧料は、十分な美白効果が認められないものが多く、また、保存安定性が充分でなかったり、刺激性を有するなど皮膚に対する安全性に問題があるものも多かった。

**【0005】**

**【発明が解決しようとする課題】** 本発明は、上述従来の技術の問題点を解決し、優れた皮膚美白効果を有し、かつ十分な保存安定性および高い安全性を有する化粧料を提供することを目的とする。

**【0006】**

**【課題を解決するための手段】** 本発明者等は斯る課題を解決するため鋭意研究した結果、ケフィア粒より分離したラクトバチルス属に属する乳酸菌の菌体抽出物が、チロシナーゼ活性抑制効果、メラニン生成抑制効果および活性酸素消去効果を兼ね備え、優れた美白効果を発揮することを見出し、本発明を提供することができた。

**【0007】** すなわち、本発明は、ケフィア粒から分離したラクトバチルス属乳酸菌の菌体抽出物を配合したことを特徴とする化粧料に関するものである。

**【0008】**

**【作用】** 本発明の化粧料は、以下のような方法で製造することができる。

**【0009】** まず、ケフィア粒を10%還元脱脂乳に接種し、20℃で毎日植え継いで活性化させる。次いで、この活性化ケフィア粒をラクトバチルス属乳酸菌体分離用培地を用いて培養し、ラクトバチルス属乳酸菌体（培養した際にガスを産出しないホモ醗酵型乳酸菌の任意の菌体）を分離する。なお、ラクトバチルス属乳酸菌体分離用培地としては、たとえば乳酸菌の培養の際に一般的に用いられるRogosaの培地（Eftymiou, C, and Hansen, P.A. 1962 Journal of Infectious Disease 110, p. 258 - 267）の組成のうち、炭素源をブドウから糖乳糖に代えた培地（以後L-Rogosa培地と略す）を用いることができる。

**【0010】** 次に、上記のようにしてケフィア粒から分離した菌体を培地に接種し、20℃ないし35℃の温度で静置培養あるいは緩やかな攪拌培養を行う。培養後、得られた培養液を遠心分離するなどして菌体を集める。集められた培養菌体は、そのまま直ちに次に述べる抽出操作に供してもよく、あるいは、凍結、凍結乾燥などを行い保存することもできる。なお、ラクトバチルス属乳酸菌の培養の際に用いる培地としては、例えばRogosaの培地など、使用菌が生育し得る培地を使用することができる。

**【0011】** 次いで、生菌体、凍結後融解した菌体、または乾燥菌体1重量部または1容量部に対して、溶剤を2~10重量部または2~10容量部加え、0~40℃にて1~24時間抽出を行い、得られた濾液を濃縮することによって目的の菌体抽出物（抽出液）を得る。なお、上記溶剤としては、低級アルキルアルコール（メタノール、エタノール、インプロパノール）および水の単独液またはこれらの2種以上の混合液を使用することができる。また、上記菌体抽出物（抽出液）は、必要に応じてさらに濃縮・乾燥することにより固形抽出物とすることもできる。

**【0012】** このようにして得た菌体抽出物は、チロシナーゼ活性抑制効果、メラノーマ細胞におけるメラニン生成抑制効果、および活性酸素消去効果を有することが本発明者等によって確認されており、この抽出物を有効成分として0.01~5%配合することにより、美白効果ならびに活性酸素消去効果を有する化粧料を得ることができる。

**【0013】** 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。しかし本発明の範囲は以下の実施例により制限されるものではない。

**【0014】****【実施例】**

（1）ケフィア粒からラクトバチルス属乳酸菌の分離。

**【0015】** まず、クリスチャン・ハンセン社（デンマーク・コペンハーゲン）より入手したケフィア粒を、1

(3)

4

05℃で20分殺菌した10%還元脱脂乳に接種し、20～22℃で毎日植え継ぎ、ケフィア粒を活性化させた。次いで、活性化したケフィア粒約2gを滅菌した乳鉢に採取し、これに炭素源としてブドウ糖の代わりに乳糖を用いたRogosaの培地（以下L-Rogosa培地と略す）2mlを加え、ケフィア粒を十分に摩砕した。

【0016】次に、微細化したケフィア粒を含む懸濁液をL-Rogosaの培地で10段階に希釈し、適当な希釈段階の希釈液0.1mlをあらかじめ作製しておいたRogosa寒天培地（寒天濃度1.5%）上にコンラージ棒を用いて塗布した。次いで、この寒天培地をガスパックジャーを用いて30℃で4日間嫌氣的に培養した。培養後、光学顕微鏡を用いて生じたコロニーの中から長桿菌状を示す菌を約20個分離し、これらの菌をそれぞれ新たなL-Rogosa寒天培地を用いてシングルコロニーアイソレーションを3回繰り返して純化した。

【0017】純化後、得られた分離株の液体培養時における性質を調べるため、各菌株をネジ栓付き試験管中のL-Rogosa液体培地に接種し、密栓後30℃で24～48時間静置培養し、培養終了時にガスの産出が認められない株を選択した。本実施例では、このようにして得た数株のうちの任意の1株を代表株R202として用いることにした。

【0018】R202株の菌学的性質は下記の通りであった。

## 形態

・細胞の大きさ ……1～1.2×5～20μm \*

(A)	ペプトン（極東製薬製）	200	(g)
	粉末酵母エキス（極東製薬製）	100	(g)
	リン酸1カリウム	5	(g)
	リン酸2カリウム	5	(g)
	クエン酸3アンモニウム	10	(g)
	酢酸ナトリウム（無水）	10	(g)
	コハク酸ナトリウム	5	(g)
	Tween80	5	(g)
	MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	2.3	(g)
	MnSO <sub>4</sub> ・(4～6)H <sub>2</sub> O	0.48	(g)
	FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.14	(g)
	蒸留水	4	(l)
(B)	乳糖	500	(g)
	蒸留水	6	(l)

【0020】滅菌後、上記基礎培地と乳糖水溶液とを混合し、L-Rogosa液体培地で前培養しておいたR202株の培養液100mlを接種し、30℃で5日間緩やかに攪拌（100rpm）しながら培養した。なお、培養開始後24時間目からは、20%炭酸ナトリウム水溶液（高圧滅菌済み）を用いてpH5.6の中和培養を行った。培養終了後、遠心分離（5,000×g、15分間）によって菌体を集め、集めた菌体を生理食塩水で洗浄した後、再び遠心分離によって菌体を集め、500mlの蒸留水に懸濁し、-20℃のフリーザーで1夜凍結保存した。

- \*・形状 ……桿状
- ・運動性 ……なし
- ・胞子の有無 ……なし
- ・グラム染色 ……陽性

## 培地における生育状態

（ガスパック法により、L-Rogosa寒天平板培地表面で30℃、4日間培養した場合におけるコロニーの性状）

- ・形状 ……円形
- ・大きさ ……直径0.5～3mm
- ・色調 ……白色

## 生理学的性質

- ・硝酸塩の還元 ……なし
- ・色素の生成 ……なし
- ・カタラーゼ ……陰性
- ・生育範囲 ……温度：20～35℃、pH：5.0～6.5

・酸素に対する態度 ……通性嫌気性

なお、上記の菌学的性質を示す菌株（R202株）は、工業技術院微生物工業研究所（微工研）に微工研菌寄第12624号として寄託した。

【0019】（2）ラクトバチルス属乳酸菌体抽出物の調製

まず、以下に示す（A）の組成で基礎培地、および

（B）の組成で乳糖水溶液を調製し、120℃で20分間、別々に高圧滅菌した。

【0021】次に、凍結した菌体懸濁液を室温で融解後、全量1リットル、終エタノール濃度20%となるように、エタノールと蒸留水を加え、25℃で緩やかに攪拌（100rpm）しながら24時間抽出を行った。抽出後、得られた抽出液を遠心分離して大部分の菌体を除き、その上澄液を1回濾過して約900mlの濾液を得た。次いで、この濾液をエバポレーターによって減圧濃縮し、約50mlの濃縮液を得た。得られた濃縮液は、透析チューブに入れて約1リットルの蒸留水中で1夜（4℃）透析を行った。透析後、透析外液をエバポレーターによって減圧濃縮し、50

mlの濃縮液(R202株の菌体抽出物)を得た。

【0022】(3)ラクトバチルス属乳酸菌体抽出物のチロシナーゼ活性抑制率の測定試験まず、試験管に100mMコハク酸ナトリウム緩衝液(pH5.5) 1.8ml、270 units/mlマッシュルームチロシナーゼ溶液(シグマ社製) 0.1ml、および試料溶液(

【0023】(2)で得たR202株の菌体抽出物) 0.1mlを入れて混合し、30℃の恒温水層で15分間インキュベートした。次いで、この試験管に6mM L-DOPA 溶液(和光純薬工業製:上記100mMコハク酸ナトリウム緩衝液に溶解したもの) 1mlを加えて攪拌した。攪拌後、この試験管を30℃の恒温室中に設置した往復振とう機に約45°傾けてセットし、40分間振とう(往復回数150/分)した。振とう後、分光光度計を用いて475nmの吸光度を測定し、その測定値をAとした。

【0024】一方、対照として、試料溶液の代わりに上記コハク酸ナトリウム緩衝液を加えたこと以外は上記と同様にして475nmの吸光度を測定し、その測定値をBとし、また、L-DOPA溶液の代わりに上記コハク酸ナトリウム緩衝液を加えたこと以外は上記と同様にして475nmの吸光度を測定し、その測定値をCとした。

【0025】上記475nmの吸光度の測定値から試料溶液のチロシナーゼ活性抑制率を算出した。なお、チロシナーゼ活性抑制率の算出は、以下の計算式を用いて行い、その結果を表1に示した。

$$\text{チロシナーゼ活性抑制率}(\%) = \{1 - (A - C) / B\} \times 100$$

【表1】

チロシナーゼ活性抑制効果	
菌体抽出液添加量 ( $\mu$ l)	抑制率 (%)
50	67
100	83
200	88

【0026】(4)ラクトバチルス属乳酸菌体抽出物のB16メラノーマ細胞におけるメラニン生成抑制効果測定試験

まず、メラニンを生成するマウス由来の悪性黒色腫細胞であるB16メラノーマ細胞(B16-F0、ATCC No. CRL-6322)を、ウシ胎児血清を終濃度10%となるように添加したイーグルMEM培地で培養し、6ウェルプレート(FALCON)の各ウェルに、該細胞を $3 \times 10^5$ /mlの濃度で含む上記培地を6ml入れ、CO<sub>2</sub>インキュベーター(5%CO<sub>2</sub>、37℃)内で5日間培養した。

【0027】次いで、この培地を0.03%のティオフィリン(シグマ社製)を含む新しいイーグルMEM培地(6

ml)に交換し、各ウェルに適当な量の試料溶液((2)で得たR202株の菌体抽出物)を添加した後さらに3日間培養した。培養終了後、培地を捨てて各ウェルに1mlの生理食塩水を加え、スクレーパーを用いてウェルの底面に付着している細胞をかきとるように懸濁させた。次に、ピペットを用いて該細胞懸濁液をマイクロ遠心チューブ(1.5ml容量、エッペンドルフ社製)に移し、遠心分離(10,000×g、15分間)した。

【0028】一方、対照として、試料溶液の代わりに滅菌水を添加して上記同様の試験を行った。また、細胞の白色化を比較するための実験区として、試料溶液の代わりに2%L-アスコルビン酸水溶液を(a)60 $\mu$ l、(b)150 $\mu$ l、(c)300 $\mu$ l添加し、上記同様の試験を行った。

【0029】次に、ペレットとなった細胞の白色化の度合を目視で比較し、メラニン生成抑制効果の判定を行った。その際、対照実験区(滅菌水添加区)の細胞の白色の度合を「-」、L-アスコルビン酸を添加した比較実験区の細胞の白色の度合をそれぞれ(a):「+」、(b):「++」、(c):「+++」として、試料溶液を添加した場合の細胞の白色の度合が一、+、++、+++のどれに当てはまるかを目視で判断し、試料溶液のメラニン生成抑制効果の強さとして4段階の判定を行った。なお、その結果は表2に示した。

【表2】

菌体抽出液の添加量 ( $\mu$ l)	メラニン生成抑制
100	+
200	++
300	+++

【0030】(5)ラクトバチルス属乳酸菌体抽出物の活性酸素消去効果の測定試験

活性酸素消去効果の測定はスーパーオキシド・ディスムターゼ(SOD)の活性測定法のうち、チトクロームCを用いる方法に準じて行った。

【0031】まず、分光光度計用キュベット(4ml容量、光路1cm)に試料溶液((2)で得たR202株の菌体抽出物)を0.01mlから1mlの範囲で入れ、このときの試料溶液の量をAmlとした。次に、100mM トリス塩酸緩衝液(pH7.8)を(2.7-A)ml、1mM チトクロームC溶液(上記トリス塩酸緩衝液に溶解したもの)を0.1ml、キサンチンオキシダーゼ溶液(ベーリンガーマンハイム社製、製品番号110434を上記トリス塩酸緩衝液で80倍に希釈したもの)を0.1ml、および15mMキサンチン溶液(0.025規定NaOH溶液に溶解したもの)を0.1ml加え、攪拌した。攪拌後、30℃の恒温キュベットホルダーをセットしている分光光度計により、550nmの吸光度の変化(増加)を測定し、吸光度の増加速度の初速をVと

した。

【0032】また、活性酸素消去作用を比較するための実験として、試料溶液の代わりにスーパーオキシド・ディスムターゼ（SOD）溶液（シグマ社製、製品番号S-2515を上記トリス塩酸緩衝液で希釈し、終濃度を10活性単位/mlとなるように調製したもの）についても上記同様に550nmの吸光度の変化（増加）を測定し、吸光度の増加速度の初速Vを求めた。

【0033】一方、比較として、試料溶液の代わりにスーパーオキシド・ディスムターゼ（SOD）溶液（シ\*10

\*グマ社製：製品番号S-2515を上記トリス塩酸緩衝液で希釈し、終濃度を10活性単位/mlとなるように調製したもの）についても上記同様に550nmの吸光度の変化（増加）を測定し、吸光度の増加速度の初速をV<sub>0</sub>とした。

【0034】上記測定したVおよびV<sub>0</sub>から試料溶液の活性酸素消去率を算出した。なお、活性酸素消去率の算出は、以下の計算式を用いて行い、その結果を表3に示した。

$$\text{活性酸素消去率 (\%)} = (1 - V/V_0) \times 100$$

【表3】

活性酸素消去率			
菌体抽出液 の添加量 ( $\mu$ l)	消去率 (%)	SOD添加量 (活性単位)	消去率 (%)
20	44	1	27
25	54	2	38
30	60	3	47
40	67	4	51
50	71	5	57
		6	61

上記結果から、25 $\mu$ lの試料溶液はSODとして4活性単位以上を含むと判定された。

【0035】（6）化粧水の組成

※

※（2）で得たラクトバチルス属乳酸菌体抽出物を用い、以下に示すような配合の化粧料を製造することができる。

（重量%）

・菌体抽出物	1
・グリセリン	5
・ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート	1.5
・エタノール	10
・香料	適量
・防腐剤	適量
・色素	適量
・精製水	適量

【0036】

【発明の効果】ケフィア粒より分離されたラクトバチルス属に属する乳酸菌の菌体から溶媒によって抽出される抽出物は、優れたチロシナーゼ活性抑制効果、ならびに★40

★メラノーマ細胞における優れたメラニン生成抑制効果、および活性酸素消去効果を有しており、この抽出物を配合した化粧料は、優れた皮膚美白効果および活性酸素消去効果を発揮する。